

# UN PREMIER PAS VERS L'ETUDE DU COLLAGENE DU CARTILAGE ARTICULAIRE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Nathalie ACCART<sup>1</sup>, Christel GENOUD<sup>2</sup>

Adresse courriel de l'auteur de correspondance : nathalie.accart\_gris@novartis.com

1. *Novartis Institute of Biomedical Research, Musculoskeletal Diseases Area, Histology and Imaging Group – BASEL - SWITZERLAND*

2. *Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research  
BASEL - SWITZERLAND*

## ABSTRACT

Articular cartilage is a highly specialized tissue covering the surface of bones included in diarthrodial joints and it allows mechanical movements with low friction and facilitates the transmission of loads to the underlying subchondral bone. With an increasing number of patients suffering of pathologies like osteoarthritis or rheumatoid arthritis, articular cartilage study becomes more and more important. Articular cartilage is a subject of choice for studies by high resolution imaging technique like transmission electron microscopy (TEM), but this technique is complex because of the preponderant extracellular matrix, composed essentially of proteoglycans and collagen, and because of the difficulty to preserve and stain it to get ultrastructural information. To verify our methodology and reproduce the data already published on cartilage imaging by TEM, and therefore correlate images with collagen content, we applied TEM for the study of meniscus and femoral cartilage plateau of a hindlimb knee joint of adult rat. With a classical and specific preparation for TEM favoring collagen preservation instead of proteoglycans, we were able to reproduce published data and to differentiate both tissues function

of their main collagen type. Next step will be to use these TEM images for the validation of scanning electron microscopy (SEM) we would like to obtain from the same type of tissues.

## KEY WORDS

**Cartilage ; Collagen ; Electron Microscopy**

## RESUME

Le cartilage articulaire est un tissu très spécialisé recouvrant la surface des os impliqués dans les articulations diarthrodiales et permet des mouvements avec peu de friction en facilitant la transmission des charges à l'os sous-chondral. Etant donné le nombre croissant de patients souffrant de pathologies telles que l'ostéoarthrite et l'arthrite rhumatoïde, l'étude du cartilage articulaire prend de plus en plus d'importance. Le cartilage articulaire est un sujet de choix pour être étudié par une technique d'imagerie de haute résolution comme la technique de microscopie électronique à transmission (MET). Mais cette approche est complexe due à la prépondérance de la matrice extracellulaire, composée essentiellement de protéoglycanes et de collagène et qu'il est très difficile de préserver et colorer pour en extraire des informations sur son ultrastructure. Afin de vérifier notre méthodologie pour reproduire des données déjà disponibles sur l'imagerie du cartilage par MET, et ainsi corrélérer les images avec le contenu en collagène, nous avons appliqué la MET à l'étude du ménisque et du plateau cartilagineux fémoral d'une articulation du genou de la patte postérieure d'un rat adulte. Grâce à la préparation classique du tissu pour la MET focalisant sur la préservation du collagène au détriment des protéoglycanes, nous avons pu reproduire les données publiées et différencier les deux tissus en fonction de leur type de collagène prépondérant. La prochaine étape de notre travail sera d'utiliser ces images de MET pour valider les images de microscopie électronique à balayage (MEB) que nous aimerions générer à partir des mêmes tissus.

## MOTS CLES

**Cartilage ; Collagène ; Microscopie Electronique**

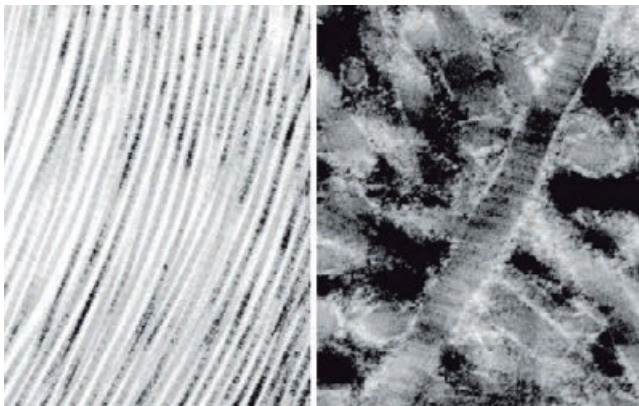
## INTRODUCTION

Le cartilage hyalin articulaire est composé de chondrocytes immergés dans une matrice extracellulaire composée principalement de deux molécules que sont les protéoglycanes et le collagène. Ce dernier forme le squelette structural du tissu. Les collagènes spécifiques du cartilage sont les collagènes de type II, IX, X et XI, les autres types I, III, V, VI, XII et XIV sont plus universellement distribués [1-4]. Les collagènes de type I, II, III, V et XI sont des collagènes fibrillaires alors que la plupart des autres collagènes sont des fibrilles présentant des triples hélices interrompues, souvent associés aux collagènes fibrillaires [5-7]. Les exceptions à ces groupes sont le collagène de type X, à chaîne courte, et le collagène de type VI, qui n'a pas encore été classifié [8]. Les études du cartilage en microscopie électronique à balayage (MEB) ont mené à des résultats controversés. Pour s'affranchir des différentes méthodes de préparation qui produisent différents résultats [9, 10], les études les plus récentes ont été faites en utilisant la cryo-fixation pour préserver le tissu dans un état le plus proche possible de l'état naturel [11, 12]. La cryo-fixation permet soit pour la MET, soit pour la MEB, de fixer le tissu dans un état aussi proche que possible de l'état physiologique. Malheureusement l'observation des tissus dans les microscopes électroniques en mode cryo-fixé reste d'une très grande difficulté et il est nécessaire, pour la MET surtout, de faire une préparation d'échantillon permettant d'observer le tissu cryo-fixé à température ambiante, ce qui nécessite l'ajout de produits chimiques dénaturants. Finalement, des observations en cryo-fixation et avec des techniques de fixation aldéhydrique optimisées pour la préservation de la matrice extracellulaire ont permis d'imager la structure du cartilage articulaire. Les faisceaux de fibrilles de collagène empaquetés ensemble forment la matrice territoriale entourant de près les chondrocytes et formant ainsi les chondrons. La matrice interterritoriale au contraire est plus désorganisée avec des faisceaux de fibrilles de collagène moins compactes [13].

Le collagène de type I est le plus abondant dans la majorité des tissus comme l'os, les tendons et ligaments, la peau, la cornée et plusieurs tissus conjonctifs interstitiels, à l'exception du cartilage hyalin, du cerveau et du corps vitreux. Il est aussi retrouvé dans le fibrocartilage du ménisque. La triple hélice du collagène de type I est habituellement formée d'un hétérodimère de deux chaînes  $\alpha 1(I)$  et une chaîne  $\alpha 2(I)$ . La triple hélice de procollagène est maturée en tropocollagène qui s'assemble pour donner les fibrilles. La triple hélice de collagène I peut être

combinée soit au collagène de type III comme dans la peau ou au collagène de type V comme dans l'os ou le tendon. Le collagène de type II représente 80% du cartilage hyalin mais on le trouve aussi dans le nucleus pulposus des disques intervertébraux. La triple hélice du collagène de type II est composée de trois chaînes  $\alpha 1(\text{II})$  formant un homotrimère. Les fibrilles du cartilage sont des hétéromères de collagène de type II combinés aux collagènes de types IX et XI qui limitent le diamètre fibrillaire à environ 15 à 50 nm. Un épissage (splicing) alternatif de l'ARN messager codant pour le collagène de type II résulte en deux formes de chaînes  $\alpha 1(\text{II})$ . Le variant IIB est trouvé dans le cartilage mature, le variant IIA est retrouvé dans la forme embryonnaire du mésenchyme préchondrogénique, les ostéophytes, le périchondre, les vertèbres et les tumeurs chondrogéniques. Le switch de IIA à IIB suggère un rôle durant le développement et le variant IIB représente un marqueur caractéristique du cartilage mature [14].

Les collagènes fibrillaires incluant les collagènes de types I, II, III, V et XI sont caractérisés par leur aptitude à s'assembler en agrégats supramoléculaires orientés, avec une suprastructure caractéristique de diamètre entre 25 et 400 nm (**Figure 1**) [15, 16]. La MET permet de visualiser ces collagènes fibrillaires ainsi que la succession de bandes d'une périodicité de 70 nm environ, appelée D-période, basée sur l'arrangement des monomères de collagène et pouvant être utilisée comme paramètre d'étude du collagène [17, 18]. Ces périodes sont représentées par des stries noirâtres en microscopie électronique à cause des dépôts d'osmium entre les molécules de collagène se superposant.



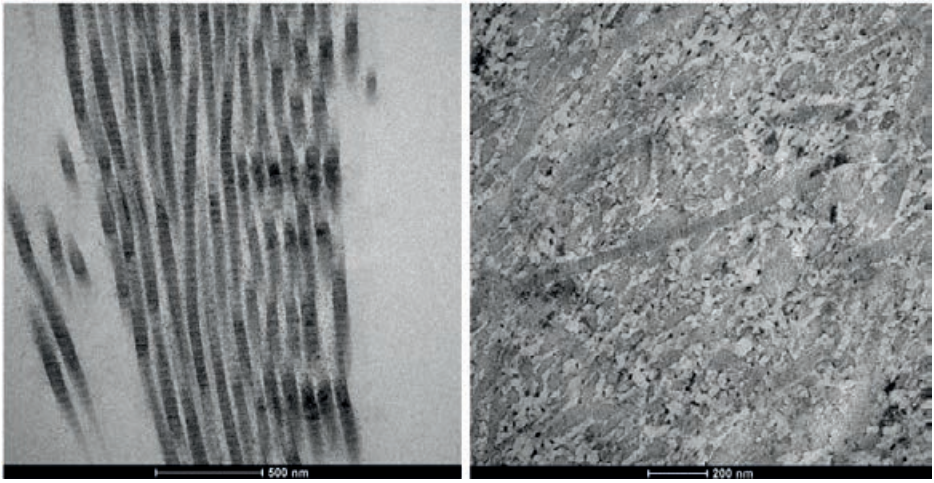
**Figure 1** : Images en Microscopie Electronique à Transmission (MET) de fibres de collagène de type I (gauche) et de type II (droite) tels qu'observés dans un tendon et dans du cartilage articulaire de rat, respectivement. Figure adaptée de [15] (absence d'échelle dans la version originale).

## MATERIELS ET METHODES

Des échantillons de ménisque et de cartilage hyalin fémoral ont été prélevés à l'aide d'un scalpel sur l'articulation du genou de rat (rat mâle de 6 mois d'âge, Lewis rats LEW/OrlRj; Janvier) après 24 heures de fixation de l'articulation dans le fixateur de Karnovsky modifié et constitué de 2% glutaraldéhyde (16320, Electron Microscopy Sciences), 2% de paraformaldéhyde (15714, Electron Microscopy Sciences) dilué dans un tampon phosphate 0,1M pH7,2 (19340-72, Electron Microscopy Sciences). Après 24 heures de fixation, les prélèvements sont rincés dans du tampon cacodylate 0,1M pH 7,4 trois fois 10 minutes. Ensuite, les échantillons ont été métallisés pendant une heure dans du tétr oxyde d'osmium à 1% dilué dans le tampon cacodylate. Après trois rinçages dans de l'eau bidistillée, les échantillons ont été déshydratés dans des mélanges eau/éthanol 30%, 50%, 70%, 90%. Après deux incubations dans de l'éthanol 100%, les échantillons ont été mis dans un mélange 50% éthanol, 50% résine Epoxy pour 1 heure avant d'être transférés dans de la résine pure pour 12 heures. Après 12 heures, la résine a été échangée avec de la résine fraîche pour une heure. Ensuite les échantillons ont été montés dans des moules plats et solidifiés 24 heures dans un four à 60 degrés. Les blocs ont ensuite été taillés avec un Em trimmer (Leica) afin d'obtenir des coupes semi fines (1 micron) observables au microscope à lumière transmise. Une fois qu'une région riche en collagène était détectée, le bloc a été taillé pour préserver la région d'intérêt et des coupes fines (50-80nm) ont été réalisées et prélevées sur des grilles (formvar coated copper slot grid). Les grilles ont été colorées 10 minutes à l'acétate d'uranyle et 10 minutes au citrate de plomb avant de pouvoir être observées au MET (FEI Tecnai Spirit 120 kV). Les images ont été obtenues avec une caméra montée de côté (Veleta).

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les échantillons de ménisque et de cartilage articulaire ont été fixés et traités d'une manière optimale ce qui a permis de distinguer les deux types de tissus comme les principaux types de collagène associés ainsi que leur organisation au sein de ces deux types de cartilage. Le **Figure 2** illustre ces observations faites à partir de coupes de ménisque ou de coupes de cartilage du plateau fémoral.



**Figure 2 :** Images en Microscopie Electronique à Transmission de fibres de collagène de type I (gauche) et de type II (droite) tels qu'observés dans le ménisque et dans le cartilage hyalin de l'articulation du genou de rat.

La microscopie électronique à transmission (MET) est une technique d'imagerie de très haute résolution qui permet donc l'étude du collagène. La mise en évidence des fibrilles permet d'envisager la mesure de leur diamètre et de la D-période. Nous espérons ainsi pouvoir utiliser la quantification de ces deux paramètres afin de déterminer la qualité du collagène au sein du cartilage articulaire.

## CONCLUSION

Nous avons pu reproduire les images de microscopie électronique à transmission, de collagène de type I, type majoritaire présent dans le fibrocartilage méniscal et de collagène de type II présent dans le cartilage hyalin de l'articulation du genou de rat. Ces premières images devraient nous aider à valider les images de microscopie électronique à balayage que nous aimerions générer à partir de coupes de tissus classiquement fixés en formol tamponné et inclus en paraffine en comparaison à des tissus fixés avec ce fixateur de Karnovsky modifié utilisé en MET.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. EYRE D.R., et al. Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS Lett* (1987),220 (2): 337-341.
2. THOMAS J.T., AYAD S. & GRANT M.E. Cartilage collagens: strategies for the study of their organisation and expression in the extracellular matrix. *Ann Rheum Dis* (1994),53 (8): 488-496.
3. WOTTON S.F. & DUANCE V.C. Type III collagen in normal human articular cartilage. *Histochem J* (1994),26 (5): 412-416.
4. WU J.J. & EYRE D.R. Covalent interactions of type IX collagen in cartilage. *Connect Tissue Res* (1989),20 (1-4): 241-246.
5. KANIA A.M., et al. Structural variation of type XII collagen at its carboxyl-terminal NC1 domain generated by tissue-specific alternative splicing. *J Biol Chem* (1999),274 (31): 22053-22059.
6. NAKANO S., et al. Differential tissular expression and localization of type IV collagen alpha1(IV), alpha2(IV), alpha5(IV), and alpha6(IV) chains and their mRNA in normal breast and in benign and malignant breast tumors. *Lab Invest* (1999),79 (3): 281-292.
7. TING K., et al. A short isoform of Col9a1 supports alveolar bone repair. *Am J Pathol* (1999),155 (6): 1993-1999.
8. NINOMIYA H., INOMATA T. & OGIHARA K. Collagen fiber arrangement in canine hepatic venules. *J Vet Med Sci* (1999),61 (1): 21-25.
9. CLARK J.M., et al. The surface contour of articular cartilage in an intact, loaded joint. *J Anat* (1999),195 ( Pt 1): 45-56.
10. HUNZIKER E.B., HERRMANN W. & SCHENK R.K. Improved cartilage fixation by ruthenium hexammine trichloride (RHT). A prerequisite for morphometry in growth cartilage. *J Ultrastruct Res* (1982),81 (1): 1-12.
11. EYRE D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* (2002),4 (1): 30-35.
12. EYRE D.R., et al. Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochem Soc Trans* (2002),30 (Pt 6): 893-899.
13. POOLE C.A. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* (1997), 191 ( Pt 1): 1-13.
14. HUGHES L.C., ARCHER C.W. & AP GWYNN I. The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review. *Eur Cell Mater* (2005),9: 68-84.
15. GELSE K., POSCHL E. & AIGNER T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* (2003),55 (12): 1531-1546.

16. SHERMAN V.R., YANG W. & MEYERS M.A. The materials science of collagen. *J Mech Behav Biomed Mater* (2015),52: 22-50.
17. HULMES D.J., et al. Electron microscopy shows periodic structure in collagen fibril cross sections. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1981),78 (6): 3567-3571.
18. HULMES D.J. & MILLER A. Molecular packing in collagen. *Nature* (1981),293 (5829): 239-234.